

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra biologických a lékařských věd**

**VLIV SUNITINIBU NA ENDOTELIÁLNÍ EXPRESI  
HEMOOXYGENÁZY-I U NORMOTENZNÍCH POTKANŮ.**

SUNITINIB EFFECTS ON ENDOTHELIAL EXPRESSION  
OF HEMEOXYGENASE-I IN NORMOTENSIVE RATS.

(Bakalářská práce)

Vedoucí práce: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD.

Barbora Svobodová

Hradec Králové 2012

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita pro získání jiného kvalifikačního titulu.“

Datum:

Podpis:

Ráda bych poděkovala Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a příjemnou spolupráci při psaní této bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu a trpělivost.

## **Abstrakt**

Barbora Svobodová

Vliv sunitinibu na endoteliální expresi hemooxygenázy I u normotenzních potkanů.

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotní laborant

Cíl práce: Cílem této práce bylo popsat a vyhodnotit expresi hemoxygenázy-1 (HO-1) v aortě normotenzních Wistar Kyoto (WKY) potkanů s ohledem na podávání sunitinibu za použití imunohistochemických a stereologických metod.

Metody: Použili jsme dvě skupiny WKY potkanů (v každé bylo 6 zvířat), přičemž jedné z nich byl podáván sunitinib a druhé (kontrolní) byla podávána pouze voda. Aplikace sunitinibu probíhala podle schématu: 8 týdnů podávání/5 týdnů pauza/2 týdny podávání. Následně jsme na 60 preparátech potkaních aort provedli imunohistochemickou analýzu, která sledovala expresi HO-1 metodikou En Vision s detekcí pomocí DAB. Poté byla provedena stereologická analýza.

Výsledky: Imunohistochemická analýza ukázala expresi HO-1 pouze u endotelových buněk a obecně lze konstatovat, že byla pozorována jen u několika zvířat, zejména ze skupiny zvířat léčených sunitinibem. Exprese HO-1 nebyla pozorována mimo cévní endotel.

Závěr: Imunohistochemická a následná stereologická analýza prokázala signifikantní nárůst exprese HO-1 u potkanů, kterým byl podáván sunitinib. Tato zvýšená exprese může souviset s rozvojem potenciálně protektivní reakce cévního endotelu na podávání sunitinibu. Podávání této látky ovlivňuje cévní endotel, takže je potřeba brát v úvahu její potenciální toxické účinky v cévním řečišti.

## **Abstract**

Barbora Svobodová

Sunitinib effects on endothelial expression of hemeoxygenase-I in normotensive rats.

Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Medical Laboratory Technician

Background: The aim of this bachelor thesis was to define and describe the expression of hemeoxygenase-1(HO-1) in the aortas of normotensive Wistar Kyoto (WKY) rats and evaluate possible effects of sunitinib treatment by means of immunohistochemical and stereological analysis.

Methods: Two groups of WKY rats were used for the experiment (6 animals in each of them). Sunitinib was administered to the first group. The other one (the control one) received water only. Application of sunitinib proceeded by following scheme: 8 weeks of using/ 5 weeks rest period/ 2 weeks of using. After that we performed the immunohistochemical analysis on 60 preparations of rat's aortas which observed the expression of HO-1 by methodology En Vision with DAB detection. Then the stereological evaluation was performed.

Results: The immunohistochemical analysis showed the expression of HO-1 in the endothelium only and it was noticed just in several animals especially from the group with sunitinib treatment.

Conclusion: The immunohistochemical and stereological analysis demonstrated a significant increase of the expression of HO-1 in rats treated with sunitinib. This increased expression could be associated with development of a potential vascular reaction to the intake of sunitinib. The administration of sunitinib affects endothelium and suggesting its potential vascular toxicity.

## Obsah

1	ÚVOD .....	8
2	CÉVY .....	9
2.1	Obecná stavba cév .....	9
2.1.1	Tuniky .....	9
2.1.2	<i>Vasa vasorum</i> .....	10
2.1.3	Inervace .....	10
2.2	Specifická stavba cév .....	11
2.2.1	Endotel .....	11
2.2.2	Arterie .....	12
2.2.3	Kapiláry .....	13
2.2.4	Vény .....	15
3	ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE .....	17
3.1	Regulace krevního tlaku .....	17
3.1.1	Minutový srdeční výdej .....	17
3.1.2	Periferní cévní odpor .....	17
3.2	Definice a klasifikace hypertenze .....	18
3.3	Etiopatogeneze a patofyziologie .....	20
3.3.1	Primární hypertenze .....	20
3.3.2	Sekundární hypertenze .....	21
3.4	Následky hypertenze .....	23
4	ZVÍŘECÍ MODEL Y .....	24
4.1	Laboratorní potkan .....	24
4.1.1	Wistar Kyoto potkani .....	25
5	SUNITINIB .....	26
5.1	Obecné vlastnosti .....	26

5.2	Mechanismus účinku .....	26
5.3	Indikace .....	28
5.4	Vedlejší účinky .....	28
5.5	Sunitinib a hypertenze .....	29
6	HEMOXYGENÁZA-1 .....	30
7	CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE .....	31
8	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	32
8.1	Sunitinib – design experimentu .....	32
8.2	Imunohistochemie .....	32
8.2.1	Metodika En Vision .....	32
8.2.2	Stereologická analýza .....	33
8.2.3	Statistická analýza .....	34
9	VÝSLEDKY .....	35
9.1	Imunohistochemická detekce HO-1 v aortě .....	35
9.2	Stereologická analýza exprese HO-1 v aortě .....	38
10	DISKUSE .....	39
11	ZÁVĚR .....	41
12	SEZNAM ZKRATEK .....	42
13	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	44

# 1 ÚVOD

Kardiovaskulární systém je jedním ze základních pilířů pro udržení stálého vnitřního prostředí (homeostázy), umožňuje distribuci nejrůznějších látek do celého těla, čímž zajišťuje zásobení tkání kyslíkem a živinami, odvod zplodin, předávání informací prostřednictvím hormonů a má mnoho dalších funkcí (1). Jeho onemocněním je věnována velká pozornost, protože jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Vyšší náchylnost k těmto chorobám mají lidé s vyšším krevním tlakem (hypertenzí). Tento jev patří k nejčastějším poruchám zdravotního stavu populace a jeho komplikace jsou rovněž významnými příčinami smrti (2).

Hypertenze se v časných stádiích často neprojevuje žádnými varovnými příznaky, je proto těžké ji včas odhalit. Z tohoto důvodu by mělo být měření krevního tlaku součástí každé návštěvy lékaře, což by mělo zajistit včasnou diagnózu a zahájení léčby (3).

Hypertenze je důležitým rizikovým faktorem aterosklerózy, cévní mozkové příhody, srdečního selhání a ledvinných komplikací. K rozvoji vzniku vysokého krevního tlaku přispívají genetické faktory, životní styl a rovněž k němu dochází při některých onemocněních, v těhotenství nebo jako vedlejší účinek léků (3). Právě léky se zabývají mnohé studie, které se snaží objasnit mechanismus vzniku hypertenze po jejich podání. Nejen k tomuto účelu se při základních výzkumech využívají zvířecí modely, které napomáhají pochopení patofyziologie jednotlivých chorob. Na těchto zvířatech jsou sledovány účinky podaných léků pomocí různých laboratorních metod. Často využívána je imunohistochemie, která dokáže odhalit přítomnost některého z markerů poškození tkáně na základě reakce antigenu s protilátkou.



## 2 CÉVY

Cévní systém je rozsáhlý soubor trubic vystlaných jednou vrstvou plochých endotelových buněk, kterými proudí tělní tekutiny, na jejichž základě rozlišujeme dva oběhové systémy (4).

Prvním je soustava mizních cév, kterou proudí lymfa vznikající v mezibuněčných prostorech většiny tkání. Lymfa je sbírána sítí mizních vlásečnic, které vytváří mizní cévy až kmeny ústící do krevních cév (4).

Druhým systémem je krevní oběh, kterým je prostřednictvím krve transportován kyslík, živiny a další důležité látky (hormony, vitamíny a jiné) do všech tkání a orgánů a odváděn oxid uhličitý k vydýchání plícemi a další zplodiny látkové výměny k vyloučení v ledvinách (4) (5).

Krev je v cévách poháněna rytmickými stahy srdce, odkud proudí tepnami (arterie) do těla, kde se postupně větví na tenkostěnné tepénky (arterioly) až vlásečnice (kapiláry), jejichž stěna je tvořena jednou vrstvou plochých endotelových buněk a kde dochází k vlastní látkové výměně. Z kapilár je krev spolu s oxidem uhličitým a dalšími látkami odváděna žilkami (venuly) a žilami (vény) zpět do srdce (4).

### 2.1 Obecná stavba cév

Krevní cévy mají podobnou strukturální stavbu, která je přizpůsobena jejich fyziologickým nárokům. Stěna cév s průsvitem  $<0,1$  mm je značně zjednodušena (viz dále). Cévy s průsvitem  $>0,1$  mm mají stěnu složenou ze 3 vrstev (tunik): vnitřní (*tunica intima*), střední (*tunica media*) a zevní vrstva (*tunica adventitia*) (6).

#### 2.1.1 Tuniky

- *Tunica intima* (intima) sestává z vrstvy endotelových buněk, které vystylají vnitřní povrch cév a jsou uloženy na bazální lamině, která je jimi produkována. Pod nimi se nachází subendotelová vrstva podélně uspořádaného řídkého vaziva, která může místy obsahovat elementy hladké svaloviny (velké cévy) (6).
- *Tunica media* (medie) se skládá z hladkých svalových buněk, mezi kterými se nachází elastická a kolagenní vlákna (obsahující především kolagen III). Mezibuněčná hmota bohatá zejména na proteoglykany vzniká činností

hladkých svalových buněk. V arteriích je medie od intimy oddělena strukturou zvanou *lamina elastica interna*, která je tvořena elastinem a opatřena otvory (fenestracemi), které umožňují difuzi živin do buněk uložených hluboko v arteriální stěně. V kapilárách a postkapilárních venulách je tato vrstva zastoupena buňkami, které se nazývají pericyty (6) (7).

- *Tunica adventitia* (adventicie) je tvořena podélně orientovanými elastickými a kolagenními vlákny (kolagen typu I) a nachází se zde fibroblasty (vytvářejí pojivovou tkáň) a adipocyty (tukové buňky). Oddělení medie od adventicie zajišťuje u větších tepen *lamina elastica externa*. Tato vrstva postupně přechází ve vazivo orgánu, kterým céva prochází (6) (7) (8).

### **2.1.2 Vasa vasorum**

Ve velkých cévách, kde je adventicie velmi silná, lze nalézt cévy cév (*vasa vasorum*), které ji zásobují kyslíkem a živinami, kterých by se jí prostou difuzí z lumen nedostalo. Tyto cévy vznikají jako větve arterie, kterou vyživují, nebo jsou zásobeny sousedními arteriemi. Vyskytují se častěji v žilních stěnách z důvodu nižší koncentrace kyslíku ve venózní krvi (6) (7).

### **2.1.3 Inervace**

Většina krevních cév, které mají ve své stěně hladkou svalovinou, je prostoupena bohatou sítí nemyelinizovaných sympatických vláken (vazomotorické nervy), jejichž mediátorem je noradrenalin. Jeho uvolnění způsobuje vazokonstrikci. U arterií tato nervová vlákna vstupují pouze do adventicie a noradrenalin musí k hladkým svalovým buňkám difundovat. Ve vénách se nachází nervová zakončení i v medii, avšak celková hustota inervace je zde nižší.

Arterie kosterních svalů obsahují i parasympatická nervová zakončení, jejichž neurotransmiterem je acetylcholin a má zde vazodilatační účinek.

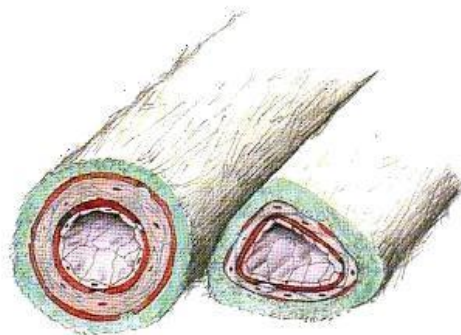
V arteriích jsou také baroreceptory (tlakové receptory podílející se na regulaci krevního tlaku) a chemoreceptory, které patří k senzorickým nervovým vláknům (6).

## 2.2 Specifická stavba cév

Přestože krevní cévy mají podobnou obecnou strukturu, liší se v závislosti na svém typu a tloušťce, což souvisí i s jejich funkcí. Stěna arterie je silnější než stěna vény o stejném průměru a má silnější vrstvu medie (viz Obrázek 1) (5) (6).

Oběhový systém je obvykle dělen na makrocirkulaci (cévy o průměru  $> 0,1$  mm), kam patří arterie elastické, svalové, smíšené, arterioly o průsvitu  $> 0,1$  mm, svalové venuly o průsvitu  $> 0,1$  mm a vény malé, střední a velké. Do mikrocirkulace řadíme cévy, jejichž průsvit je  $< 0,1$  mm (arterioly, prekapiláry, kapiláry, postkapiláry, venuly). Ty jsou viditelné pouze ve světelném mikroskopu. Všechny tyto typy cév jsou vystlány vrstvou endotelových buněk (6).

**Obrázek 1: Porovnání stěny arterie (vlevo) a vény (4) str. 70**



### 2.2.1 Endotel

Endotelové buňky jsou mezenchymálního původu, mají obvykle polygonální tvar, jsou protáhlé ve směru proudu krve a v místě jádra se vyklenují směrem do lumen cévy. Acidofilní cytoplazma obsahuje nepříliš rozsáhlý Golgiho komplex, mitochondrie, cisterny endoplazmatického retikula a volné ribozomy. Nachází se zde větší počet mikrofilament, který je důležitý pro kontraktilitu buňky. Endotelie jsou vzájemně propojeny těsnými spoji (*zonulae occludens*), místy se vyskytují další buněčné spoje, jako jsou desmozomy a nexy (5) (6).

Endotel je selektivně propustný pro molekuly a buňky z krevního řečiště a dokáže reverzibilně měnit velikost mezer mezi buňkami. Vykazuje také sekreční aktivitu, která je řízena signály z kardiovaskulárního, imunitního a nervového systému. Důležitými vylučovanými látkami jsou oxid dusnatý (ovlivňuje průsvit cévy) a prostacyklin (zabraňuje agregaci krevních destiček) (8). Tyto buňky hrají významnou roli při krevním srážení, řízení krevního tlaku, metabolismu lipoproteinů a při přeměně angiotenzinu I na angiotenzin II (6).

### 2.2.2 Arterie

Arterie, které přivádí krev ze srdce do tkání, musí ve svých počátečních úsecích tlumit velké tlakové rozdíly vznikající srdeční činností, čemuž je také přizpůsobena jejich stavba. Podle velikosti je dělíme na velké arterie elastického typu, svalové arterie a arterioly (4) (6).

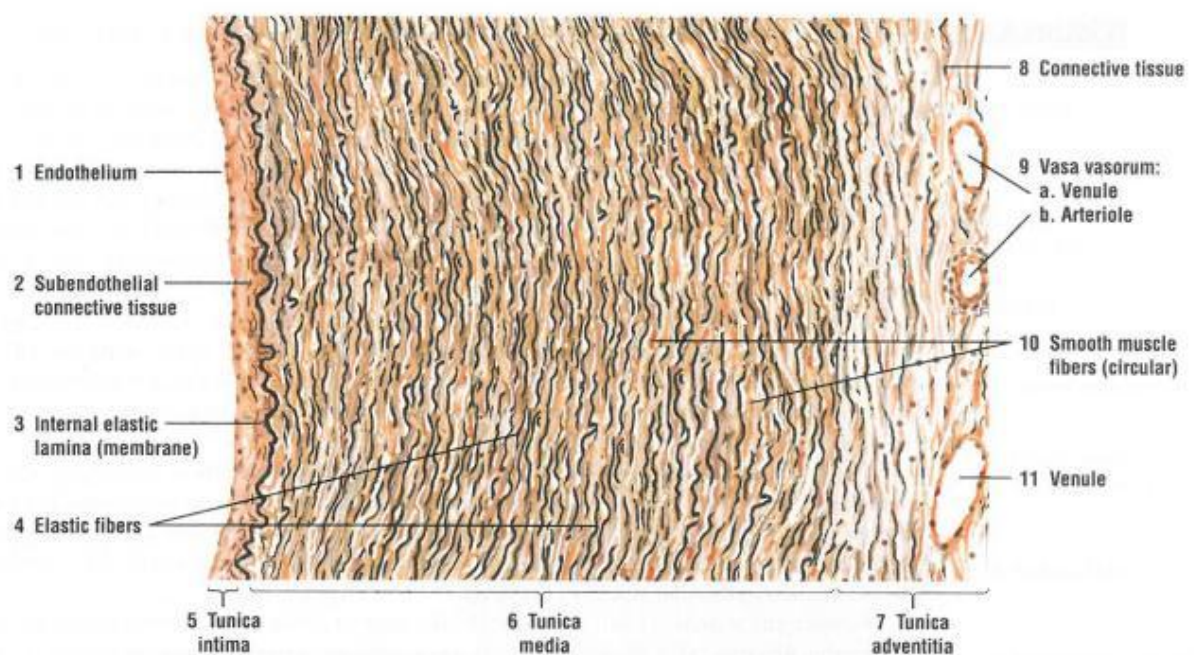
- Arterie elastického typu

Intima je vystlána endotelovými buňkami a je silnější než u ostatních typů arterií. I subendotelová vrstva je silněji vyvinuta, obsahuje vazivová vlákna, která hrají důležitou roli během deformace endotelu při rytmické kontrakci a dilataci tepen a jejich počet směrem k medii přibývá (6) (9).

Medie se skládá z mnoha elastických membrán (*membranae elasticae fenestratae*), mezi kterými se nacházejí hladké svalové buňky, retikulární vlákna a základní hmota obsahující hlavně chondroitin sulfát (6) (9).

Adventicie postrádá zevní hraniční membránu, je jen málo vyvinutá, obsahuje elastická a kolagenní vlákna a mohou se v ní vyskytovat i cévy cév (obr.2). K tomuto typu arterií se řadí aorta a její hlavní větve (6).

**Obrázek 2: Stěna elastické arterie** (10) str. 179



- Arterie svalového typu

Intima těchto tepen je opět vystlána endoteliemi, pod kterými se v subendotelové vrstvě mohou nacházet svalové buňky. Na rozhraní s medií je zřetelně vyvinuta vnitřní elastická blanka (6).

Medie obsahuje velké množství hladkých svalových buněk, které jsou proloženy retikulárními vlákny a proteoglykany. Elastických vláken je zde méně než v předchozím typu. Ve větších svalových arteriích je přítomna *membrana elastica externa* (6) (11).

Adventicii tvoří kolagenní a elastická vlákna spolu s malým počtem fibroblastů a tukových buněk. Nachází se zde také lymfatické cévy, *vasa vasorum* a nervy. Většina arterií v lidském těle je tohoto typu (6).

- Arterioly

Arterioly mají stejně jako ostatní cévy lumen vystláno endotelovými buňkami, subendotelová vrstva je velmi tenká a *lamina elastica interna* se nachází pouze u velkých arteriol. Medie je tvořena 1-5 cirkulárně uspořádanými vrstvami hladkých svalových buněk. Adventicie je tenká bez vyvinuté vnější elastické blanky, má fibroelastický charakter a vazivová vlákna probíhají převážně longitudinálně (6) (9).

Arterioly se větví do prekapilár, které obsahují nesouvislou vrstvičku svalových buněk, které před rozvětvením do kapilár vytvářejí prstenec (prekapilární sfinkter) (9).

### 2.2.3 Kapiláry

Kapiláry jsou základní funkční jednotkou cévního systému, dochází zde k vlastní látkové výměně. Jsou tvořeny jednou vrstvou endotelových buněk, jejichž zevní povrch zpravidla spočívá na bazální lamině. Kapiláry mají průměr mezi 7 až 9 µm a vytvářejí síť, jejíž hustota závisí na metabolických a funkčních potřebách orgánů (5) (6).

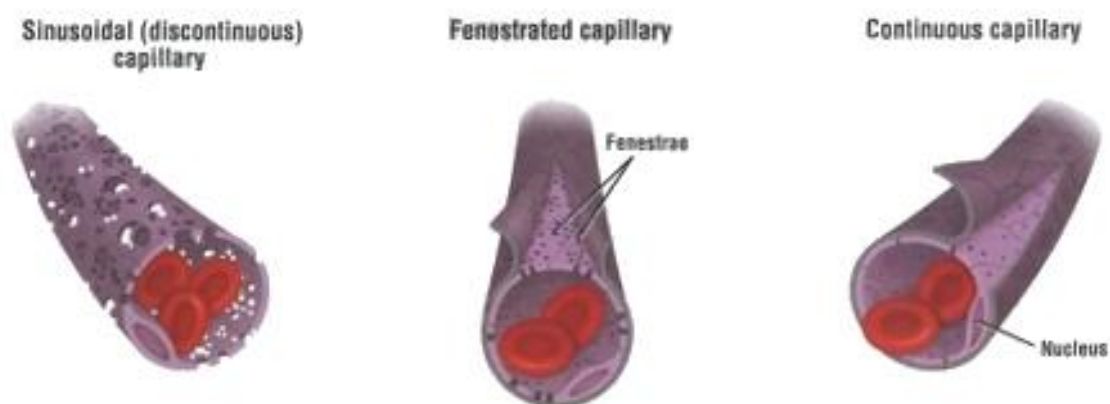
Kapiláry obklopuje nesouvislá vrstva podpůrných buněk mezenchymálního původu zvaných pericyty. Mají obvykle dva výběžky, kterými obemykají endotelie a jsou součástí bazální membrány (6) (9).

Dle struktury endotelových buněk a charakteru bazální laminy dělíme kapiláry do 4 skupin.

- Souvislé (somatické) kapiláry jsou lemovány endotelovými buňkami bez pórů a fenestrací, nachází se ve všech typech svalů, ve vazivu, nervové tkáni a exokrinních žlázách. Sousední buňky jsou spojeny prostřednictvím *zonulae occludentes*. Ve svalových kapilárách lze nalézt četné pinocytární váčky, které zajišťují obousměrný transport makromolekul skrz endotelovou buňku. Tyto váčky jsou velmi řídké či zcela chybí v souvislých kapilárách v nervovém systému, což je spojováno s existencí hematoencefalické bariéry (6) (9).
- Fenestrované (viscerální) kapiláry mají ve stěnách endotelových buněk rozsáhlé fenestrace o průměru 60-80 nm, které jsou uzavřeny ultratenkou blankou (diafragmou), na jejíž vnější straně je bazální lamina. Tento typ kapilár usnadňuje průchod větších molekul a nachází se v místech s rychlou výměnou látek mezi krví a tkáněmi, jako je tomu např. ve střevech, ledvinách a endokrinních žlázách (4) (6) (11).
- Kapiláry s póry jsou vystlány endotelovými buňkami, které mají ve svých výběžcích vytvořené otvory, které však nejsou překryty diafragmou. Je zde pouze kontinuální bazální lamina. Kapiláry s póry jsou charakteristické pro ledvinná tělíska (7).
- Sinusoidy mají nepravidelné lumen a nápadně rozšířený průsvit (30-40  $\mu\text{m}$ ), který zpomaluje průtok krve. Stěna endotelových buněk obsahuje fenestrace bez diafragmat. Bazální lamina často není souvislá a mezi endoteliemi se nacházejí otevřená mezibuněčná spojení a četné makrofágy. Sinusoidní kapiláry díky své struktuře usnadňují výměnu látek v játrech a hematopoetických orgánech, jako je slezina a kostní dřeň (6) (7) (11).

Krevní kapiláry se spojují v postkapilární venuly, které dále přecházejí ve venuly (9).

**Obrázek 3: Tři typy kapilár.** Sinusoidní, fenestrovaná a souvislá kapilára (10) str. 170



#### 2.2.4 Vény

V žilním systému se nachází přibližně 70% celkového objemu krve, která je vedena do srdce. Medie vén je v porovnání s arteriemi slabší, avšak adventicie bývá mohutněji vyvinuta. Vény můžeme rozdělit dle velikosti na venuly a vény malé, střední a velké (5) (6).

- Venuly

Venuly mají průměr 0,2–1 mm a jejich stěna je složena z intimy s endotelovými buňkami, tenké medie s žádnou nebo několika málo vrstvami hladké svaloviny a z adventicie, která je nejsilnější a je tvořena vazivem s převahou podélně orientovaných kolagenních vláken (5) (6).

- Malé a střední vény

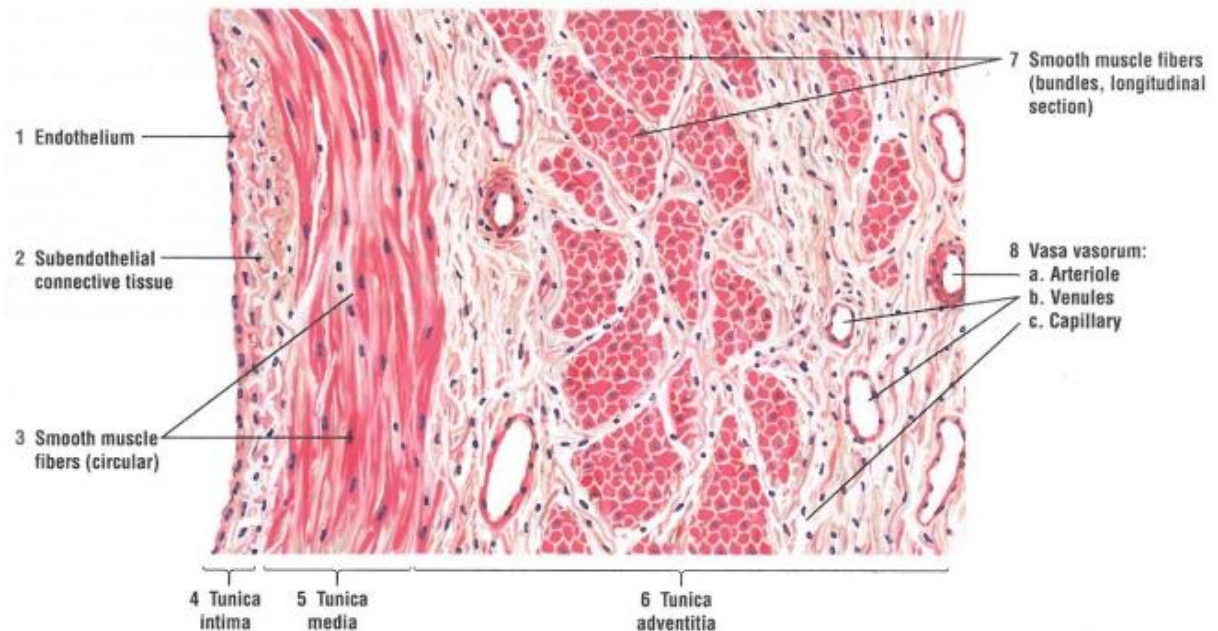
Tyto žíly mají průměr mezi 1-9 mm a v jejich intimě lze většinou nalézt tenkou subendotelovou vrstvu. *Tunica intima* ve vénách končetin vytváří chlopně, které zabraňují zpětnému toku krve. Jsou to dvě poloměsíčitě vychlípeniny z elastického vaziva kryté endotelem, které čnějí do lumen žíly. V medii se nacházejí malé svazčky hladké svaloviny smíšené s retikulárními a elastickými vlákny. Adventicie je bohatá na kolagenní vlákna a je dobře vyvinuta (6) (11).



- Velké vény

Velké vény mají dobře vyvinutou intimu a tenkou medii s několika málo vrstvami svalových buněk a velkým množstvím vaziva. Nejsilnější a mohutně vyvinutou vrstvou je adventicie, ve které se nachází vazivo spolu s cirkulárně a longitudinálně uspořádanou hladkou svalovinou, která napomáhá čerpat krev směrem k srdci a zabraňuje roztažení cév. Můžeme zde nalézt i cévy cév (obr.4) (6).

**Obrázek 4: Stěna velké vény.** Nejmhutněji vrstvou je adventicie s velkým množstvím svalových buněk (10) str. 179





### 3 ARTERIÁLNÍ HYPERTENZE

Krevní tlak jakožto síla působící na stěnu cév je výsledkem činnosti srdce v interakci s periferním odporem. Ve velkých tepnách je tlak přibližně stejně velký jako v aortě, postupně klesá a v kapilárách již krev nepulzuje. Lze jej charakterizovat systolickým tlakem (vypuzovací fáze systoly), diastolickým tlakem (nejnižší hodnota během diastoly) a středním tlakem (efektivní tlak, který působí v arteriálním řečišti a na jehož hodnotě závisí perfuze orgánů a tkání). Vysoký krevní tlak je označován jako hypertenze (1) (12).

#### 3.1 Regulace krevního tlaku

Velikost tlaku krve je dána srdečním výdejem a periferním odporem cévního řečiště. Právě na jejich ovlivnění je založen mechanismus regulace krevního tlaku (13).

##### 3.1.1 Minutový srdeční výdej

Minutový srdeční výdej je řízen především autonomním vegetativním nervovým systémem, který má vliv na sinoatriální uzel. Sympatikus působící přes svůj mediátor noradrenalin má na srdce obecně pozitivní inotropní (zvýšení síly srdeční kontrakce), chronotropní (zrychlení srdeční frekvence), dromotropní (zrychlení síňokomorového převodu) a bathmotropní (zvýšení vzrušivosti myokardu) efekt. Parasympatikus působí pomocí acetylcholinu a má negativní inotropní (snížení síly srdeční kontrakce), chronotropní (zpomalení srdeční frekvence), dromotropní (zpomalení síňokomorového převodu) a bathmotropní (snížení vzrušivosti myokardu) efekt (14) (15).

##### 3.1.2 Periferní cévní odpor

Periferní cévní odpor je regulován na systémové a lokální úrovni.

###### 3.1.2.1 Systémová úroveň regulace

Systémovými regulátory jsou autonomní vegetativní nervový systém, renin-angiotenzin-aldosteronový systém a vazopresin.

- Sympatikus autonomního vegetativního nervového systému způsobuje především vazokonstrikci cév a parasympatikus má hlavně vazodilatační účinek (14).

- Renin-angiotenzin-aldosteronový systém reaguje na snížení tlaku (a tím i snížení průtoku krve ledvinami) sekrecí reninu, který aktivuje angiotenzinogen na angiotenzin I. Ten je konvertujícím enzymem přeměněn na angiotenzin II, který vyvolává sekreci aldosteronu a spolu s ním působí vazokonstrikčně, čímž dochází k vzestupu tlaku (16).
- Vazopresin (ADH, antidiuretický hormon) ovlivňuje krevní tlak regulací vylučování vody v distálním a sběracím kanálku v ledvině (12).

### 3.1.2.2 Lokální úroveň regulace

Lokálními regulátory jsou myogenní reakce cév, metabolické a humórní činitele.

- Myogenní reakce cév spočívá v odpovědi malých arterií a arteriol na roztažení jejich stěn (vlivem tlaku krve) kontrakcí (12).
- Metabolické činitele, kteří ve zvýšené koncentraci způsobují vazodilataci, jsou oxid uhličitý, vodíkové ionty, ADP, AMP a laktát. Tato vazodilatace vede k zlepšení dodávky kyslíku a živin (12).
- Humórní činitele mají účinek především na mikrocirkulaci. Endotelin vyvolává vazokonstrikci, oxid dusný (NO) a acetylcholin působí vasodilatačně (14) .

Pro okamžitou regulaci tlaku jsou ve stěnách cév uloženy baroreceptory (reagují na zvýšený krevní tlak) a chemoreceptory (hlídají parciální tlak kyslíku v krvi). Na dlouhodobé regulaci se podílejí ledviny, a to kontrolou objemu tekutin v organismu. Vyšší TK vyvolá zvýšení diurézy a vylučování sodíku (14) (15).

## 3.2 **Definice a klasifikace hypertenze**

Podle kritérií WHO (*World Health Organisation*, Světová zdravotnická organizace) je za arteriální hypertenzi považováno opakované naměření zvýšeného systolického tlaku  $\geq 140$  mm Hg a/nebo zvýšení diastolického tlaku  $\geq 90$  Hg. Vyšší hodnoty musí být naměřeny alespoň ve dvou ze třech měření, které jsou na sobě časově nezávislé. Klasifikace hypertenze dle výšky krevního tlaku (TK) je v tabulce 1 (2).

**Tabulka 1. Definice hypertenze podle Evropské společnosti pro hypertenzi a Evropské kardiologické společnosti (2003) (2).**

Kategorie	Systolický TK (mm Hg)	Diastolický TK (mm Hg)
Optimální tlak	<120	<80
Normální	120-129	80-84
Vysoký normální tlak	130-139	85-89
Mírná hypertenze Hypertenze 1. stupně	140-159	90-99
Středně závažná hypertenze Hypertenze 2. stupně	160-179	100-109
Těžká hypertenze Hypertenze 3. stupně	≥ 180	≥ 110
Izolovaná systolická hypertenze	≥ 140 a více	< 90

Hypertenzi lze klasifikovat dle několika dalších hledisek. Prvním z nich je podle orgánového postižení, kde rozlišujeme 4 stádia:

- Stadium I je charakterizováno pouhým zvýšením TK bez orgánových změn (3).
- Stadium II zahrnuje orgánové změny, funkce orgánů však není výrazněji porušena (hypertrofie levé srdeční komory, mikroalbuminurie, kalcifikace aorty) (2).
- Stadium III představuje hypertenzi s poruchou funkce orgánů (ischemická choroba srdeční, selhání levého srdce, cévní mozková příhoda, renální selhání) (3).
- Stadium IV neboli maligní hypertenze je klinický stav s rychlým průběhem, který i přes léčbu může končit smrtí (3).

Dalším kritériem pro klasifikaci je příčina vzniku onemocnění (etiologie), na jejímž základě rozlišujeme primární a sekundární hypertenzi. Tímto dělením se blíže zabývá další kapitola.

### 3.3 Etiopatogeneze a patofyziologie

#### 3.3.1 Primární hypertenze

Primární hypertenze je onemocnění multifaktoriální povahy bez známé vyvolávající organické příčiny a je diagnostikováno u 95% pacientů s vysokým TK (3). Známý jsou pouze některé dílčí faktory.

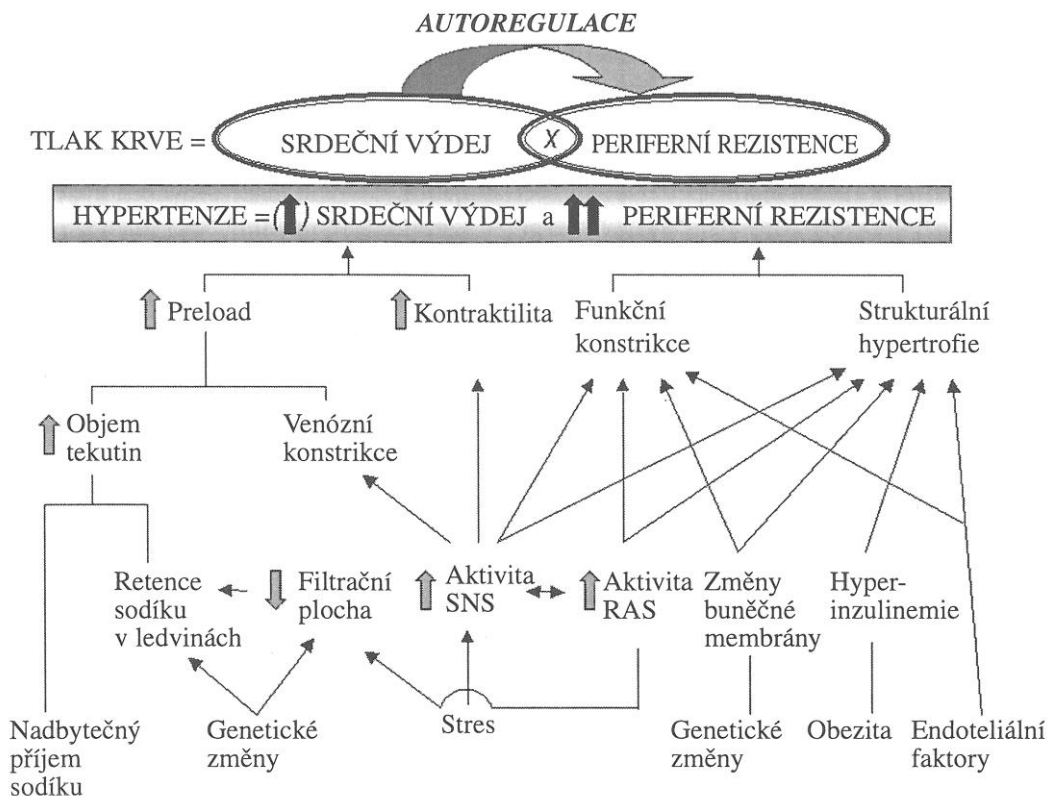
Prvním z nich je genetická predispozice. Většinou je genetický podíl na onemocnění vyvolán změnou ve více genech (polygenní typ dědičnosti), jen velmi vzácně se vyskytují onemocnění, při kterých je zvýšení TK zapříčiněno odchylkou pouze jednoho genu (monogenní typ dědičnosti). Předpokládá se, že asi 20-40% variability krevního tlaku je u člověka podmíněno geneticky (2).

Zevní prostředí je dalším faktorem, pod kterým se skrývá nadměrný příjem kuchyňské soli (nad 6 g/den), nedostatek draslíku, vápníku a hořčíku, obezita, zvýšený příjem alkoholu, kouření a stres (2).

Dalším činitelem jsou endogenní faktory, které rozlišujeme na presorické a depresorické vlivy a změny transportních mechanismů elektrolytů. Mezi depresorické, které mají vazokonstrikční účinek, patří katecholaminy, renin-angiotensinový systém, aldosteron a některé působky uvolňované endotelem cév. K depresorovým vlivům s dilatačním působením počítáme kalikrein-kininový systém, dopamin, prostaglandin E-2, prostacyklin, atriální natriuretický peptid a endoteliální relaxační faktor (EDRF). Poruchy transportních mechanismů přes buněčnou membránu mohou vést ke zvýšení intracelulárního  $\text{Na}^+$  a následně i  $\text{Ca}^{2+}$ , což má za následek zvýšenou citlivost hladké svaloviny cév na presorické vlivy (2) (3).

Všechny výše uvedené vlivy spolu interagují a vyvolávají hypertenzi. Mechanismus jejího vzniku znázorňuje Obrázek 5.

**Obrázek 5: Schéma základních patofyziologických mechanismů vedoucích k chronickému zvýšení TK s vyznačením možného vlivu genetických faktorů a faktorů prostředí (13) str. 87.**



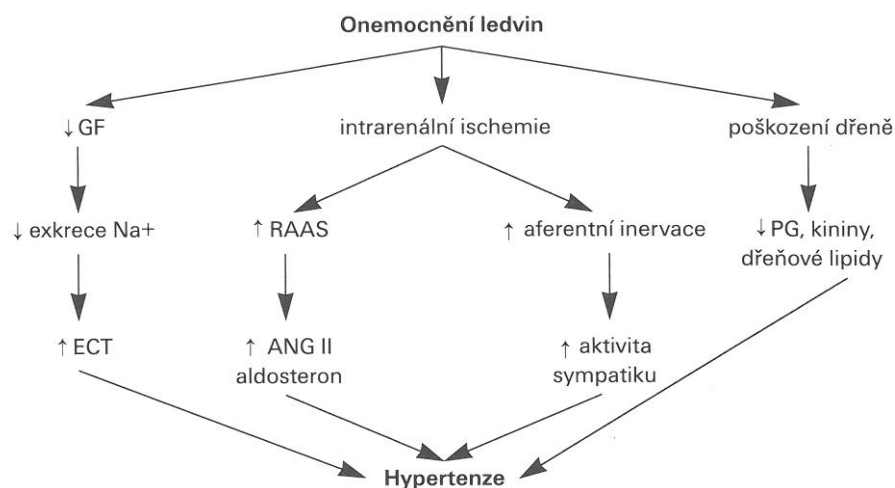
### 3.3.2 Sekundární hypertenze

U tohoto typu onemocnění lze zjistit organickou příčinu, podle které můžeme hypertenzi dále dělit.

#### 3.3.2.1 Renální

Jedná se o nejčastější typ sekundární hypertenze, který může být vyvolán zúžením renální arterie (renovaskulární hypertenze). Ta zde vede k uvolňování reninu a tím aktivaci renin-angiotenzin-aldosteronového systému. I další onemocnění ledvin jako jsou glomerulonefritida, insuficience ledvin a cystické ledviny způsobují renální hypertenzi (viz. obr. 6) (2) (17).

**Obrázek 6: Faktory vzniku renální hypertenze.** GF-glomerulární filtrace, RAAS-renin-angiotenzin-aldosteronový systém, PG-prostaglandiny, ECT-extracelulární tekutina, ANG – angiotenzin (2) str. 465



### 3.3.2.2 Endokrinní

Hypertenze může vzniknout i v důsledku nadměrné sekrece hormonů kůry nadledvin (mineralkortikoidy, glukokortikoidy, androgeny) nebo dřeň nadledvin (katecholaminy – adrenalin a noradrenalin). Nadměrná sekrece může být vyvolána nádorem nadledvin, abnormální aktivací hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osy nebo enzymatickými defekty v syntéze kortikoidů (13).

Nadbytek mineralkortikoidů (aldosteron) způsobuje reabsorpci sodíku a vody a exkreci draslíku, čímž se zvětší objem extracelulární tekutiny a tím dojde k vzestupu tlaku (17).

Cushingův syndrom (nadbytek glukokortikoidů - kortizolu) je nejčastěji zapříčiněn nadprodukcí adenohypofyzárního adrenokortikotropního hormonu nebo nádorem nadledvin. Kortizol se podílí na regulaci vylučování vody (aktivuje mineralkortikoidní receptory), a proto jeho nadbytek také vede k hypertenzi (2) (17).

Feochromocytom je nádorové onemocnění, které je příčinou trvalé nebo záchvatovité (paroxysmální) formy hypertenze (13). Buňky tohoto nádoru syntetizují z aminokyseliny tyrozinu katecholaminy a ty způsobují v cévách vazokonstrikci a zvýšení srdečního výdeje (2).

Také nadbytek exogenních estrogenů může vést k retenci  $\text{Na}^+$  a tím i k hypertenzi (17) (13).

#### 3.3.2.3 Neurogenní

Řada onemocnění nervového systému (encefalitida, mozkový tumor, krvácení do mozku nebo jeho edém) může vést k hypertenzi prostřednictvím zvýšené aktivaci sympatiku.

Existují i další příčiny vyvolávající zvýšení tlaku krve, patří mezi ně léky (např. dlouhodobé perorální užívání kortikosteroidů), zúžení aorty (vyvolává zvýšenou činnost srdce) a hypertenze se vyskytuje i v těhotenství a po některých transplantacích.

### 3.4 **Následky hypertenze**

Dlouhodobá hypertenze vede ke vzniku hypertrofie levé komory (zvětšení masy myokardu), což je kompenzační mechanismus, kterým se srdce adaptuje na jeho větší zatížení (3). Dále dochází k strukturálním změnám cév, vlivem hypertrofie hladké svaloviny a zvyšováním obsahu extracelulárního kolagenu se ztlušťuje cévní medie a tím se zužuje jejich průsvit. Cévy ztrácejí schopnost vazodilatace a zvyšuje se jejich periferní rezistence, což se projeví dalším zvýšením krevního tlaku a za určitých podmínek hypoperfuzí tkání. Další změny mohou nastat na úrovni endotelu, jehož poškození může vyvolat vznik fibrózních a aterosklerotických plátů (3).

Tyto změny srdce a cév jsou spolu s dalšími faktory rizikové pro vznik ischemické choroby srdeční, chronického srdečního selhání, arytmie, cévní mozkové příhody a dalších onemocnění. Při dlouhodobé hypertenzi může dojít i k poškození ledvin (2) (3).

## 4 ZVÍŘECÍ MODEL Y

Pokusy na zvířatech jsou prováděny již dlouhou dobu. Jejich největší rozmach začal v renesanci, v té době však nebyly používány dostatečné tlumící prostředky a záhy začala vznikat první hnutí proti týrání zvířat. Dnes je týrání zvířat definováno zákonem a je snaha o co nejohleduplnější přístup k používání zvířat v laboratořích. To je vystiženo koncepcí tří R, která se skládá těchto bodů (18):

- Replacement – náhrada pokusů na zvířatech alternativní metodou (*in vitro*, *in silico*, využití videí při výuce).
- Reduction – snižování počtu pokusných zvířat na co nejnížší možnou mez, která je však schopná poskytnout validní výsledek.
- Refinement – zjemnění používaných metod, využívání anestetik a analgetik, omezení stresu (18).

Zkoumání modelových zvířat primárně neslouží k poznání jich samotných, ale očekává se, že objevy na nich poskytnou informace, které budou využitelné i pro lidský organismus (19).

Ideální zvířecí model by měl co nejlépe napodobovat lidské nemoci se symptomy, které jsou předvídatelné a kontrolovatelné. Měl by umožnit studium chronického stádia onemocnění a měření biochemických a hemodynamických parametrů (19).

Nejčastěji užívanými zvířaty jsou myši, potkani, morčata a králíci (18).

### 4.1 Laboratorní potkan

Toto zvíře je využíváno kvůli své ekonomické nenáročnosti, relativně krátké délce života (lze sledovat přežívání) a velkému počtu potomků (20). Avšak stejně jako každý zvířecí model má svá omezení a nedostatky. V případě kardiovaskulárních chorob je prvním problémem rychlost propuknutí příznaků, která je u lidí obvykle velmi pomalá, spojená s mnoha adaptačními mechanismy. U potkanů dochází k poměrně rychlému nástupu příznaků.

Dalším rozdílem je fakt, že kardiovaskulární poruchy nejsou příliš časté u mladých lidí a jejich počet stoupá s věkem. K výzkumu jsou však většinou používány mladí potkani.



Poslední komplikací je ateroskleróza, která je u hypertenze a srdečního selhání velkým rizikovým faktorem, ale k jejímu rozvoji u potkanů často nedochází ani při udržování vysokých hladin lipidů v krvi (19).

Při studium hypertenze slouží laboratorní potkani především k objasnění patofyziologie a sledování následků vysokého krevního tlaku a k testování účinnosti antihypertenziv (20).

#### **4.1.1 Wistar Kyoto potkani**

Kmen WKY (*Wistar Kyoto rat*) byl vyšlechtěn Národním institutem zdraví v USA v roce 1971 z outbredního kmene Wistar chovaného na japonské univerzitě v Kyotu (21). Postupným příbuzenským křížením potkanů (bratr x sestra) s požadovanými vlastnostmi vznikl kmen inbrední, jehož jedinci jsou geneticky prakticky stejní, což je výhodné pro interpretaci výsledků studií (19).

WKY potkan má bílou barvu, samice dosahuje váhy kolem 200 g a samec přes 300 g (22). Tento kmen vznikl jako normotenzní kontrola pro SHR potkany (*Spontaneously Hypertensive rat*), kteří byli vyšlechtěni křížením jedinců se spontánně vyšším krevním tlakem (19).

Oba kmeny pocházejí ze stejné kolonie (Wistar) a používají se pro výzkum kardiovaskulárních onemocnění, zvláště pro studium mechanismu vzniku hypertenze. Ta se u SHR potkanů rozvíjí ve 12.-14. týdnu jejich života a je závažnější u samců než u samic (19). V časných stádiích mají tito potkani zvýšený srdeční výdej a normální celkový periferní odpor cév. Později dojde k normalizaci srdečního výdeje, avšak vlivem vazokonstrikce vzroste periferní odpor cév (20). SHR potkani se dožívají 18-24 měsíců, což je podstatně méně než průměrná délka života zdravého jedince (3 roky).

WKY a SHR jsou také velmi užitečnými genetickými modely pro mapování a identifikaci genů zodpovědných za vznik hypertenze.

## 5 SUNITINIB

### 5.1 Obecné vlastnosti

Sunitinib je malá molekula působící jako selektivní inhibitor tyrosinkinázových receptorů (RTK = *receptor tyrosine kinase*), které jsou spojeny s nádorovým růstem a novotvorbou cév (angiogenezí) (23). Tato látka je chemicky N-[2-(diethylamino)ethyl]-5-[(Z)-(5-fluoro-1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidin)methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxamid a vyskytuje se jako sůl sunitinib malát, což je žlutooranžový prášek. Je podáván perorálně, nejčastěji ve formě kapslí (Obrázek 7) (24).

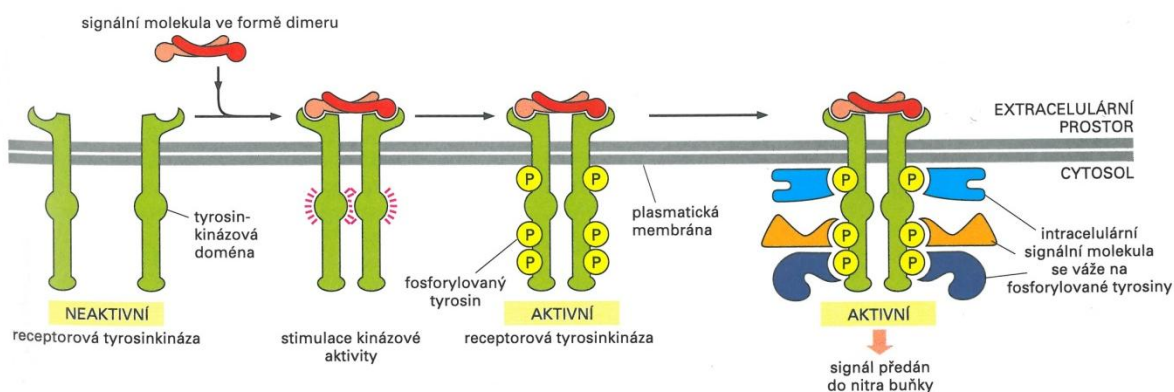
**Obrázek 7: Kapsle se sunitinibem (45).**



### 5.2 Mechanismus účinku

Sunitinib působí na RTK, které patří do skupiny membránových receptorů spojených s enzymy. Cytoplazmatická doména těchto receptorů funguje jako tyrozinová proteinkináza a katalyzuje přenos fosfátových skupin z ATP na OH skupinu tyrozinu. Obsazení receptoru ligandem většinou vyvolá spojení dvou receptorových molekul (vznik dimeru), čímž se aktivuje jejich funkce kinázy a vzájemně se fosforylují. Tento děj vyvolá vznik komplexu intracelulárních signálních molekul, které se samy stávají aktivními a předávají signál dál do buňky. (25)

**Obrázek 8: Aktivace receptorové tyrozinkinázy (25).**



Dle ligandů, které se na tyto receptory váží, rozlišujeme několik typů. Nejdůležitějšími ligandy pro receptory, které ovlivňuje sunitinib jsou (26):

- PDGF (*platelet derived growth factor*, růstový faktor destiček) je rodina peptidových růstových faktorů, které prostřednictvím svých receptorů PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*, receptor pro růstový faktor destiček) stimulují buňku k růstu, proliferaci a diferenciaci. Aktivované receptory fosforylují velké množství dalších molekul (více než 20). PDGF je syntetizován fibroblasty, keratinocyty, neurony, endoteliálními a epiteliálními buňkami. PDGFR se nachází na povrchu monocytů, megakaryocytů, fibroblastů, endoteliálních buněk, osteoblastů a na membráně erytroidních a myeloidních prekurzorů v kostní dřeni (26).
- VEGF (*vascular endothelial growth factor*, vaskulární endoteliální růstový faktor) je skupina růstových faktorů s protiapoptickým účinkem (26). Hrají významnou roli při angiogenezi, která je klíčová pro růst nádoru a tvorbu metastáz (27). Působí přes VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*, receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor) a zesilují transkripční aktivitu endoteliální NO syntázy, čímž dochází k produkci oxidu dusného, který způsobuje vazodilataci (28).
- SCF (*stem cell factor*, růstový faktor kmenových buněk) působí přes KIT (*stem cell factor receptor*, receptor pro růstový faktor kmenových buněk), který je exprimován na povrchu hematopoetických progenitorových buněk a je důležitý pro jejich správný vývoj. (29)
- Ligand pro Flt-3 (*Fms-like tyrosine kinase-3*, Fms podobné kinázy 3) má stejně jako SCF účinky na hematopoetické buňky.

Sunitinib byl identifikován jako inhibitor některých typů receptorů pro výše uvedené ligandy. Konkrétně působí na PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, KIT, Flt-3 a některé další (receptory pro kolonie stimulující faktor typu 1 - CSF-1, receptory pro neurotrofický faktor odvozený od gliálních buněk – RET) (23) (30). Molekula sunitinibu se váže na místo určené

pro ATP, čímž zamezuje fosforylaci proteinů a přenosu signálu dále do buňky (24). Dochází k omezení angiogeneze a tím i poklesu krevního zásobení nádoru, což brzdí jeho růst (24). Dále zvyšuje apoptózu u endoteliálních a náborových buněk (23).

### **5.3 Indikace**

Léčba sunitinibem se používá u pacientů s gastrointestinálním stromálním tumorem (GIST) a pacientů s pokročilým renálním karcinomem (RCC) (23) (31) .

GIST je vzácné onemocnění, které je však nejčastěji se vyskytujícím mezenchymálním nádorem trávicího traktu a většinou vzniká mutací KIT (90%) a PDGFR (5%) (23) (32) (33). Sunitinib se používá po neúspěšné léčbě imatinibem, což je selektivní inhibitor KIT a PDGFR, který však po delší době užívání vede k sekundární mutaci, po níž se stává imatinib neúčinný (33). Účinnost sunitinibu byla prokázána při randomizované, placebem kontrolované a dvojitě slepé studii, během které bylo pacientům podáváno 50 mg léku denně v šestitýdenních cyklech, které se skládaly ze 4 týdnů užívání léku a 2 týdnů přestávky (23).

RCC zahrnuje heterogenní skupinu nádorových onemocnění, jejichž léčba byla v minulosti založena na imunoterapii cytokiny (interferon- $\alpha$ ). Studie však prokázaly vyšší účinnost sunitinibu jako léku první volby u metastatického karcinomu ledviny v porovnání s interferonem- $\alpha$  (23) (34).

### **5.4 Vedlejší účinky**

Sunitinib je u pacientů s GIST a RCC většinou dobře tolerován, nežádoucí účinky bývají mírné, avšak objevují se u většiny pacientů (83% pacientů GIST). Vážné nežádoucí účinky při léčbě GIST se objevily u 20 % pacientů, které u 9% vedly k přerušení léčby (23). K nejčastěji se vyskytujícím nežádoucím účinkům patří únava, průjem, změna barvy kůže, nevolnost, anorexie a hypertenze. Dalšími vedlejšími účinky jsou krvácení do tumoru, leukopenie, neutropenie, lymfopenie, trombocytopenie, porucha funkce štítné žlázy (23) (24).

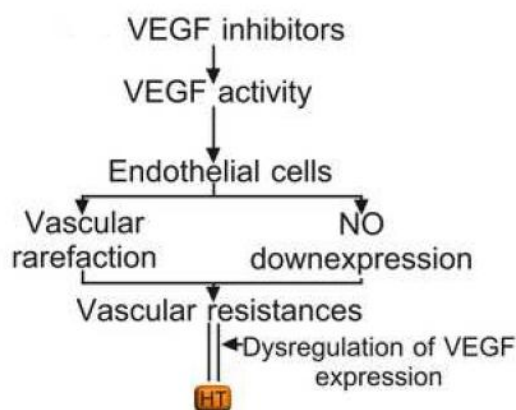
## 5.5 Sunitinib a hypertenze

Hypertenze je jedním z nejčastěji se vyskytujících vedlejších účinků vyvolaných terapií inhibitory angiogeneze. Zvýšený krevní tlak byl zjištěn u 21,6% pacientů léčených sunitinibem a u 6,8% pacientů tato léčba významně zvýšila riziko rozvoje vysokého stupně hypertenze (35).

Mechanismy vzniku nejsou zcela známy, společnými znaky hypertenzních pacientů jsou změny v mikrocirkulaci a pokles pružnosti cévní stěny a aktivity oxidu dusného. Novodobé studie naznačují, že inhibitory VEGFR snižují produkci NO v endoteliálních buňkách, což může způsobovat zvýšení cévního odporu a endotelovou dysfunkci vedoucí k hypertenzi (obr. 9). (28).

Pacienty léčené sunitinibem je vhodné pravidelně kontrolovat a v případě potřeby včas zahájit antihypertenzivní léčbu (28).

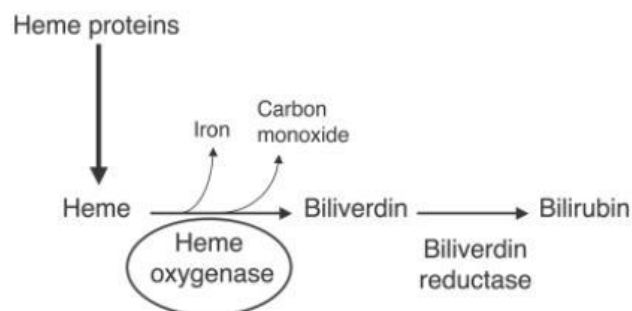
**Obrázek 9: Působení VEGF inhibitorů na hypertenzi (HT).** VEGF inhibitory snižují aktivitu VEGF, čímž ovlivňují endoteliální buňky, které reagují sníženou expresí NO a dochází k řídnutí cév, což vede k zvýšení cévního odporu a následně k hypertenzi (28).



## 6 HEMOXYGENÁZA-1

Hemoxygenáza (HO) je enzym katalyzující degradační přeměnu hemu na biliverdin za současného odštěpení železa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a oxidu uhelnatého (CO). Vzniklý biliverdin je dále degradován enzymem biliverdinredukázou na bilirubin.

**Obrázek 10: Schéma degradace hemu (36).**



HO se vyskytuje ve dvou hlavních izoformách. Obě vykazují homologii ve 45% své aminokyselinové sekvence, ale jsou rozdílně regulovány a exprimovány. Hemoxigenáza-1 (HO-1) je indukovatelná přítomností hemu, NO, růstového faktoru a dalších látek. Nachází se v endoplazmatickém retikulu většiny buněk a hraje roli při odpovědi tkáně na její poškození. Hemoxygenáza-2 je exprimována kontinuálně v mitochondriích buněk mozku, varlat, ledvin, v distálních částech nefronu a v myenterickém plexu. Podílí se na fyziologické regulaci buňky (36). Pro účely této bakalářské práce se dále zabýváme pouze HO-1.

HO-1 má protektivní účinky, které jsou zprostředkovány přes produkty reakce, kterou tento enzym katalyzuje. Chrání buňku při oxidačním stresu, působí protizánětlivě (snížení exprese adhezních molekul), vazodilatačně a brání apoptóze. Vzniklý CO ovlivňuje regulaci cévního tonu, agregaci krevních destiček a proliferaci buněk hladké svaloviny. Bilirubin má antioxidační a protizánětlivé účinky (36) (37).

HO-1 je běžně nedetekovatelná ve většině tkání, lze ji však prokázat při buněčném stresu, který je vyvolán například zánětem, poruchou imunity nebo transplantací. Ke zvýšení exprese HO-1 dochází u mnoha onemocnění včetně kardiovaskulárních, mezi kterými je i hypertenze. (36) (37). Studie naznačují, že zvýšení cévní, srdeční a renální HO-1 je odpověď na přítomnost vyšší hladiny angiotenzinu II. Toto zvýšení vede k vyšší produkci CO, který má schopnost inhibovat odpověď cév na vazokonstrikční stimulaci. HO-1 tím tedy chrání před dalším zvyšováním krevního tlaku (36).

## **7 CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE**

Na základě předchozích výsledků jsme v této bakalářské práci chtěli popsat a vyhodnotit expresi HO-1 v aortě normotenzních WKY potkanů s ohledem na podávání léčiva sunitinibu za použití imunohistochemických a stereologických metod.

## **8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **8.1 Sunitinib – design experimentu**

V experimentu jsme sledovali vliv dlouhodobého podávání sunitinibu (10 mg/kg za den v pitné vodě) WKY potkanům.

První skupině zvířat byl podáván sunitinib, druhá skupina pak sloužila jako kontrola a potkanům byla podávána místo léčiva pouze voda. V každé skupině bylo 6 zvířat. Aplikace sunitinibu (nebo čisté vody u kontrolní skupiny) probíhala každý den po dobu 8 týdnů, což představuje dvakrát delší časový úsek, než je doporučovaná doba užívání u pacientů. Po těchto 8 týdnech bylo podávání na 5 dní přerušeno, čímž byl potkanům poskytnut čas na zotavení. Poté měla následovat aplikace sunitinibu po dobu dalších 8 týdnů, u WKY potkanů však bylo možno léčivo podávat pouze další 2 týdny, protože u nich docházelo k úbytku tělesné hmotnosti a k projevům výrazných příznaků celkové toxicity.

Usmrcení zvířat proběhlo 24 hodin po poslední dávce.

### **8.2 Imunohistochemie**

Imunochemická analýza byla provedena na aortách WKY potkanů. Odebrané segmenty cév byly ponořeny do zmrazovacího média, poté zmraženy v tekutém dusíku a skladovány při -80°C. Pro vlastní analýzu byly zhotoveny série příčných řezů o tloušťce 7  $\mu\text{m}$  pomocí zmrazovacího mikrotomu. Řezy byly vloženy na sklíčko s želatinou, vysušeny vzduchem a následně fixovány v acetonu (20 min. při teplotě 20°C).

Pro detekci exprese HO-1 byla použita metodika En Vision s detekcí pomocí diaminobenzidinu (DAB).

#### **8.2.1 Metodika En Vision**

##### **8.2.1.1 Pracovní postup**

Preparáty byly fixovány 30 minut v acetonu při -20°C, poté se sklíčka nechala 30 minut sušit na vzduchu. Následně byly řezy na 5 minut vloženy do fosforečnanem pufovaného fyziologického roztoku (PBS).



Před aplikací primární protilátky bylo nutné zablokovat nespecifická vazebná místa pomocí 10% roztoku neimunního kozího séra (goat serum) ředěného v PBS. Goat serum se nechalo působit na tkáň 30 minut.

V dalším kroku již bylo možné nanést primární králíčí protilátku anti-HO-1 (anti-rat) zředěnou 1:50 bovinním sérovým albuminem (BSA). Primární protilátka se nechala inkubovat 60 minut. Dalším krokem byl oplach řezů v PBS, který byl proveden dvakrát po dobu 5 minut.

Dále byly preparáty na 15 minut vloženy do 3% peroxidu vodíku (ředěno v PBS), čímž byla potlačena endogenní peroxidázová aktivita tkáně. Po oplachu (2x5 minut v PBS) byla na 30 minut nanesena sekundární goat protilátka anti-rabbit En Vision smíchaná s potkaním sérem v poměru 50:1. Po oplachu (opět 2x5 minut v PBS) byla provedena vizualizace navázaných protilátek pomocí DAB, který působil na tkáň 45 vteřin. DAB vyvolal v místě detekce antigenu hnědé zbarvení.

Po oplachu v PBS byla jádra buněk dobarvena hematoxylinem 1/5 (5 vteřin), preparáty se nechaly modrat 1 minutu pod tekoucí vodou a pak byly opláchnuty v redestilované vodě a acetonu. Následně byly zbaveny vody v odvodňovací řadě: aceton-xylen (10:1) na 3 minuty, aceton-xylen (1:10) na 3 minuty a xylen 3x2 minuty. Na závěr bylo použito montovací médium Eukitt.

### 8.2.2 Stereologická analýza

Plocha velikosti endoteliální exprese HO-1 byla kvantifikována pomocí stereologických metod (38). Nejprve byla nakrájena série 50 řezů o tloušťce 7 $\mu$ m, následně byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez pro každé barvení byl vybrán náhodně a pak se vybral každý 10. řez, takže ke stereologickému odhadu bylo použito pět řezů pro každé barvení. Byla použita metoda bodové testovací mřížky zvolená tak, abychom napočítali více než 100 průsečíků mezi body sítě a pozitivitou HO-1 barvení na cévním endotelu na jednu cévu. Odhadovaná plocha barvení se vypočítala podle vzorce:

$$estA = a * P,$$

kde parametr  $a$  charakterizuje plochu příslušející jednomu testovacímu bodu a  $P$  je počet průsečíků mezi body testovací sítě a pozitivitou barvení.

Fotodokumentace a digitalizace snímků z mikroskopu Olympus AX 70 byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp. Ottawa, Canada) a softwarem pro obrazovou analýzu NIS (Laboratory Imaging, Czech Republic). Stereologická analýza byla hodnocena pomocí softwaru PointGrid ELLIPSE (ViDiTo, Kosice, Slovakia).

### **8.2.3 Statistická analýza**

Hodnoty uvedené v grafu ve výsledcích jsou vyjádřeny jako průměry ze zjištěných hodnot  $\pm$  SEM (standardní chyba průměru). Rozsah výběru je 6 zvířat. K porovnání rozdílů mezi skupinami byl použit nepárový t-test provedený v softwaru GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, U.S.A.). Výsledný rozdíl by brán jako statisticky významný, pokud  $p \leq 0,05$ , kde  $p$  je hladina významnosti.

## 9 VÝSLEDKY

### 9.1 Imunohistochemická detekce HO-1 v aortě

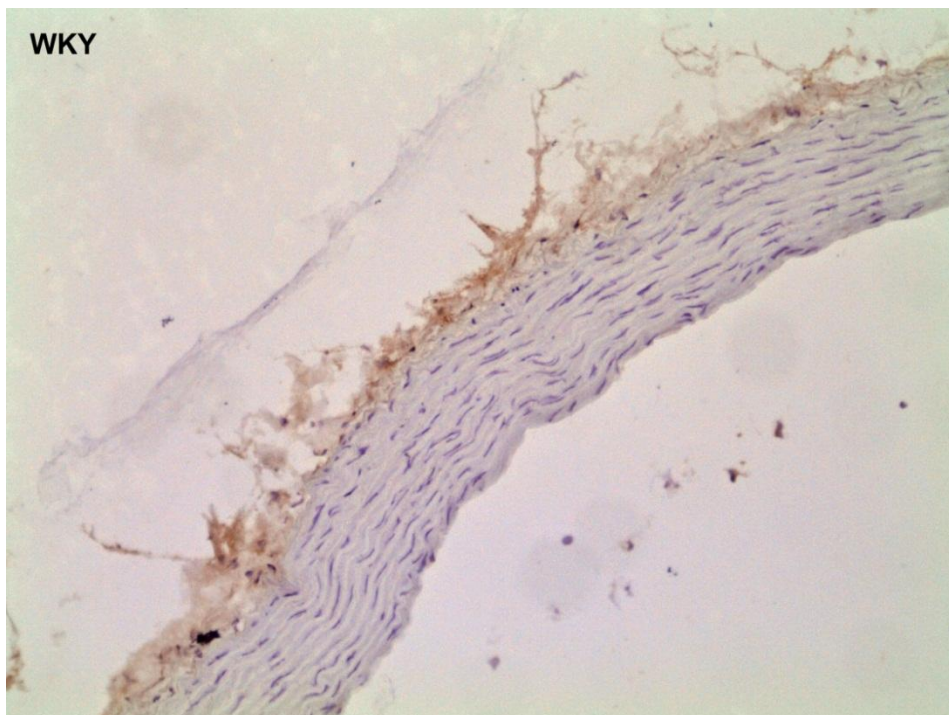
Celkově lze konstatovat, že v cévách nebyly pozorovány žádné morfologické abnormality viditelné ve světelném mikroskopu.

Imunohistochemické barvení bylo provedeno u 60 preparátů (řezů), což zahrnovalo 5 preparátů systematicky náhodně vybraných řezů z každého zvířete. V každé skupině bylo 6 zvířat. Imunohistochemická analýza ukázala expresi HO-1 pouze u endotelových buněk.

Obecně lze konstatovat, že exprese HO-1 byla pozorována pouze u několika zvířat, zejména ze skupiny zvířat léčených sunitinibem (obr. 13, 14). U ostatních zvířat exprese HO-1 nebyla patrná (obr. 11, 12). Exprese HO-1 nebyla pozorována mimo cévní endotel.

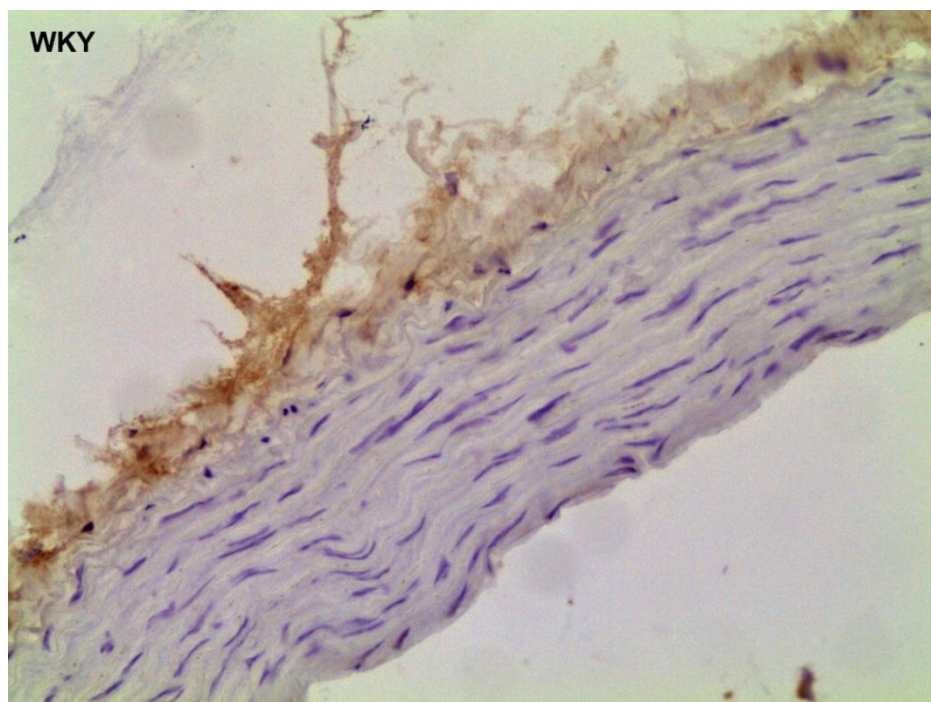
**Obrázek 11: Reprezentativní obrázek exprese HO-1 u kontrolních potkanů.**

Na obrázku není patrná žádná exprese HO-1, což byl typický znak pro tuto skupinu neléčených zvířat. Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 10x.



**Obrázek 12: Reprezentativní obrázek exprese HO-1 u kontrolních potkanů.**

Na obrázku není patrná žádná exprese HO-1, což byl typický znak pro tuto skupinu zvířat. Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 20x.

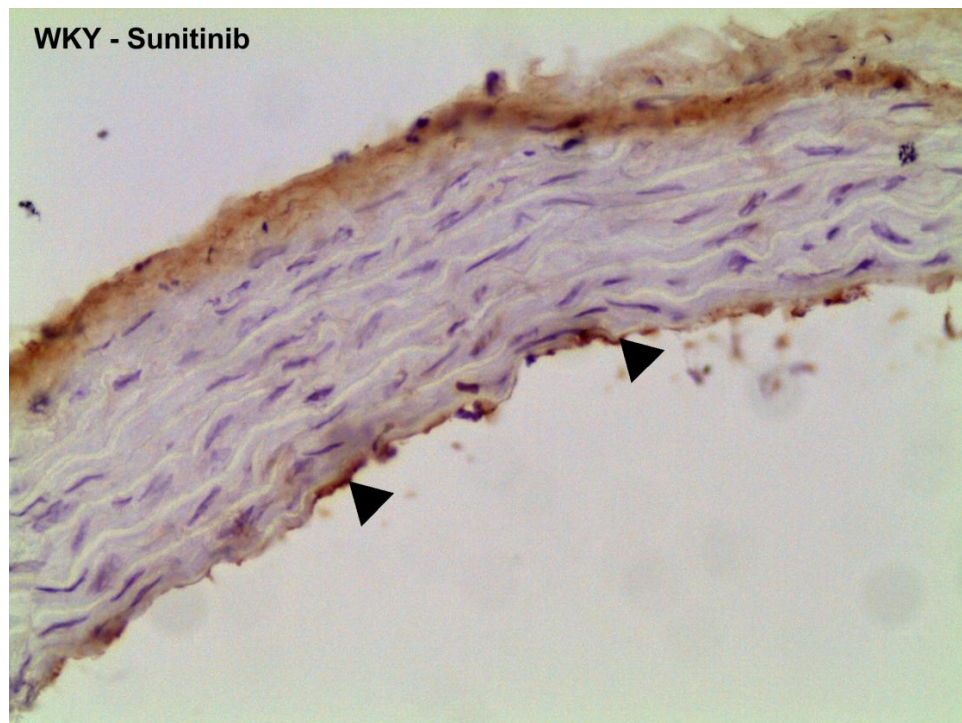


**Obrázek 13: Reprezentativní obrázek exprese HO-1 u potkanů, kterým byl podáván sunitinib.** V celé této skupině zvířat byla pozorována nízká exprese HO-1 a to pouze na cévním endotelu (šipky). Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 10x.





**Obrázek 14: Reprezentativní obrázek exprese HO-1 u potkanů, kterým byl podáván sunitinib.** V celé této skupině zvířat byla pozorována nízká exprese HO-1 a to pouze na cévním endotelu (šipky). Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 20x.

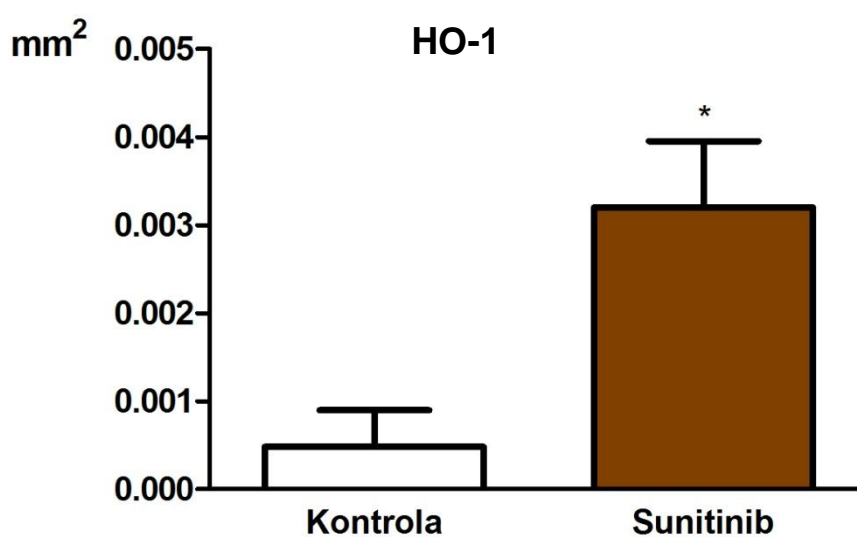


## 9.2 Stereologická analýza exprese HO-1 v aortě

Jak již bylo řečeno, exprese HO-1 byla velmi slabá u obou skupin potkanů. Cílem této kvantifikace bylo zjistit účinek podávání sunitinibu na cévní endoteliální expresi HO-1 u WKY potkanů.

Stereologická analýza prokázala nárůst exprese HO-1 na cévním endotelu po podávání sunitinibu (Graf 1).

**Graf 1: Stereologická analýza exprese HO-1 v aortě.** Podávání sunitinibu vedlo ke zvýšení exprese HO-1 ve srovnání s kontrolní skupinou. (\* $p < 0.01$ )



## 10 DISKUSE

Sunitinib je malá molekula patřící do skupiny tyrozinkinázových inhibitorů. Jeho účinnost byla doposud prokázána v léčbě předléčeného i nepředléčeného generalizovaného karcinomu ledviny a v léčbě GIST u pacientů s progresí onemocnění nebo v těch případech, kdy selhala předchozí léčba imatinibem (31). Dále se používá jako lék první volby u pacientů s RCC, u kterých vykazuje větší účinnost než interferon  $\alpha$  (33).

Cílem sunitinibu jsou tyto receptory tyrozinkináz: receptory pro růstový faktor destiček (PDGFR  $\alpha$  a PDGFR  $\beta$ ), receptory pro endoteliální růstový faktor (VEGFR-1, VEGFR-2 (Flk-1/KDR), VEGFR-3), receptory pro kolonie stimulující faktor typu 1 (CSF-1) receptory pro růstový faktor kmenových buněk (KIT), Fms protein tyrozinkinázy 3 (FIT-3) a receptory pro neurotrofický faktor odvozeného od gliálních buněk (RET) (30).

Hlavní význam sunitinibu spočívá v inhibici angiogeneze v nádorech prostřednictvím ovlivnění VEGF signalizační kaskády. Blokáda této kaskády však vyvolává pravděpodobně také inhibici produkce NO, což může vést k manifestaci některých nežádoucích účinků, kterými je např. arteriální hypertenze, která byla popsána u 21,6% pacientů léčených sunitinibem. U 6,8% pacientů tato léčba významně zvýšila riziko rozvoje vysokého stupně hypertenze (28).

Hemoxygenáza je enzym katalyzující degradační přeměnu hemu na biliverdin za současného odštěpení  $\text{Fe}^{2+}$  a CO. Hemoxygenáza se vyskytuje ve dvou hlavních izoformách, HO-1 je indukovatelná přítomností hemu a prostřednictvím dalších stimulů včetně oxidačního stresu a nachází se v endoplazmatickém retikulu většiny buněk. Hemoxygenáza-2 je exprimována kontinuálně v mitochondriích buněk mozku, varlat, ledvin, v distálních částech nefronu a v myenterickém plexu (39). Zvýšená exprese genu pro HO-1 předchází endoteliální dysfunkci díky vlivu na renin-angiotenzin-aldosteronový systém (40). Ukázalo se, že akutní zvýšení HO-1 má příznivý vliv prostřednictvím rychlého snížení hladiny hemu, který má nežádoucí oxidační účinky.

Cílem této bakalářské práce bylo popsat a kvantifikovat expresi HO-1 u normotenzních Wistar Kyoto potkanů s ohledem na podávání léčiva sunitinibu

za použití imunohistochemických a stereologických metod. Cílem bylo tedy ověřit jeho případný toxický efekt na endotel v aortě.

Exprese HO-1 byla sledována na 60 řezech aorty a byla detekována pouze na jejím cévním endotelu. Obecně lze říci, že exprese byla velmi slabá, nárůst byl pozorován u zvířat, kterým byl podáván sunitinib.

Indukce HO-1 vyvolala u některých zvířecích modelů snížení krevního tlaku. Všeobecně lze konstatovat, že exprese HO-1 působí na cévní stěnu protektivně, což je dáno jejími antioxidačními vlastnostmi, vazodilatačními a protizánětlivými účinky (snížení exprese adhezních molekul) (41). Obecně také platí, že pozitivní účinky HO-1 mohou souviset se zvýšenou produkcí CO, který má významné vazodilatační účinky a bilirubinu, který má účinky antioxidační a protizánětlivé (42).

V této bakalářské práci podávání sunitinibu vedlo ke zvýšení exprese HO-1 ve srovnání s neléčenou skupinou. Zvýšení exprese HO-1 bylo dááno do souvislosti s prevencí vzniku hypertenze a endoteliální dysfunkce (43) a v naší studii může souviset s reakcí endotelu na podávání sunitinibu. Sunitinib může vést k poškození cévního endotelu, na což on reaguje zvýšenou produkcí protektivní HO-1. V tuto chvíli nemůžeme říci jistě, zda zvýšení exprese HO-1 vede k protekci cévního endotelu, nicméně další studované markery zánětu a endoteliální dysfunkce by mohly tuto situaci objasnit.

Tyto výsledky tedy naznačují, že sunitinib ovlivňuje cévní endotel, a tudíž jeho podávání může souviset s potenciálním rozvojem endoteliální dysfunkce, což může poukazovat na jeho případné toxické účinky na cévní endotel.



## 11 ZÁVĚR

Imunohistochemická analýza ukázala expresi HO-1 pouze u endotelových buněk aorty.

Exprese HO-1 byla obecně velmi slabá u obou skupin normotenzních potkanů.

Imunohistochemická a následná stereologická analýza přesto prokázala signifikantní nárůst exprese HO-1 u potkanů, kterým byl podáván sunitinib.

Tato zvýšená exprese může souviset s rozvojem potenciálně protektivní reakce cévního endotelu na podávání sunitinibu.

Podávání sunitinibu ovlivňuje cévní endotel, takže je potřeba brát v úvahu jeho potenciální toxické účinky v cévním řečišti.

## 12 SEZNAM ZKRATEK

ADH	<i>antidiuretic hormone</i> , antidiuretický hormon
ADP	<i>adenosine diphosphate</i> , adenosindifosfát
AMP	<i>adenosine monophosphate</i> , adenosinmonofosfát
ANG	angiotenzin
ATP	<i>adenosine triphosphate</i> , adenosintrifosfát
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , bovinní sérový albumin
CO	oxid uhelnatý
CSF-1	<i>colony stimulating factor 1</i> , kolonie stimulující faktor typu 1
DAB	diaminobenzidin
ECT	extracelulární tekutina
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i> , endotelový relaxační faktor
FIt-3	<i>Fms(Feline McDonough Sarcoma)-like tyrosine kinase 3</i> , Fms podobná kináza 3
GF	glomerulární filtrace
GIST	<i>gastrointestinal stromal tumour</i> , gastrointestinální stromální tumor
HO	<i>heme oxygenase</i> , hemoxygenáza
HO-1	<i>heme oxygenase-1</i> , hemoxygenáza-1
KIT	<i>stem cell factor receptor</i> , receptor pro růstový faktor kmenových buněk
NO	oxid dusnatý
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , fosforečnanem pufovaný fyziologický roztok
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> , růstový faktor destiček
PDGFR	receptor pro PDGF (viz. PDGF)
PG	prostaglandiny
PGE2	prostaglandin E2
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteronový systém
RCC	<i>renal cell carcinoma</i> , renální karcinom
RET	<i>glial cell-line derived neurotrophic factor receptor</i> , receptor pro neurotrofický faktor odvozený od gliálních buněk
RTK	<i>receptor tyrosine kinase</i> , tyrozinkinázový receptor

SCF	<i>stem cell factor</i> , růstový faktor kmenových buněk
SEM	<i>standard error of mean</i> , standardní chyba průměru
SHR	<i>spontaneously hypertensive rat</i> , spontánně hypertenzní potkani
TK	tlak krve
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	receptor pro VEGF (viz. VEGF)
WHO	<i>World Health Organization</i> , Světová zdravotnická organizace
WKY	potkani kmene Wistar Kyoto

### 13 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ROKYTA R. a další. *Fyziologie: pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech*. 1. vydání. Praha : ISV, 2000. stránky 105-125. ISBN 80-85866-45-5.
2. WIDIMSKÝ J. a další. *Hypertenze*. 2. rozšířené a přepracované vydání. Praha : Triton, 2004. ISBN 80-7254-515-9.
3. ŠPINAR J., VÍTOVEC J. a další. *Hypertenze diagnostika a léčba*. 1. vydání. Praha : Grada, 1999. ISBN 80-7169-736-2.
4. ČIHÁK R. *Anatomie 3*. 1. vydání. Praha : Grada, 1997. ISBN 80-7169-140-2.
5. DVOŘÁK K. *Obecná a speciální histologie*. 2. přeprac. vydání. Brno : Institut pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků, 1989. ISBN 80-7013-007-5.
6. JUNQUEIRA C.L., CARNEIRO J. a KELLEY R.O. *Základy histologie*. 7.vydání. Jinočany : H&H, 1997. 80-85787-37-7.
7. KONRÁDOVÁ V., UHLÍK J. a VAJNER L. *Funkční histologie*. 2. vydání. Jinočany : H&H, 2000. ISBN 80-86022-80-3.
8. PECKA M. *Laboratorní hematologie v přehledu: Fyziologie a patologie hemostázy (3. díl)*. Český Těšín : Finidr, 2004. ISBN 80-86682-03-X.
9. MALÍNSKÝ J., LICHNOVSKÝ V. a MICHALÍKOVÁ Z. *Přehled histologie člověka v obrazech II. díl*. 2. vydání. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. ISBN 978-80-244-2277-0.
10. EROSCHENKO V.P. *DiFiore's atlas of histology with functional correlations*. 11. vydání. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2008. ISBN 1-6083-1492-8.
11. VACEK Z. *Histologie a histologická technika*. 1. vydání. Brno : Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996. ISBN 80-7013-201-9.
12. SILBERNAGL S. a DESPOPOULOS A. *Atlas fyziologie člověka*. 6. vydání (3. české). Praha : Grada, 2004. ISBN 80-247-0630-X.
13. ZICHA J. a KUNEŠ J. *Patologická fyziologie srdce a cév*. 1. vydání. Praha : Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0597-X.
14. TROJAN S. a další. *Lékařská fyziologie*. 4. vydání. Praha : Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.

15. FOX S.I. *Human physiology*. 6. vydání. Boston : McGraw-Hill, 1999. ISBN 0697-34191-7.
16. FEJFAR Z., PŘEROVSKÝ I. a další. *Patofyziologie krevního oběhu*. 2. přepracované vydání. Praha : Avicenum, 1987. ISBN 80-7262-130-0.
17. SILBERNAGL, Stefan a LANG, Florian. *Atlas patofyziologie člověka*. 1. vydání. Praha : Grada, 2001. ISBN 80-7169-968-3.
18. BALLS M. The origins and early days of the Three Rs concept. *ALTA*. vol. 37, č. 3, stránky 255-265.
19. DOGGRELL S.A. a BROWN L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular research*. 1998, vol. 39, č. 1, stránky 89-105.
20. HULÍN I. *Patofyziológia*. 6. vydání. Bratislava : SAP, 2002. ISBN 80-89104-05-3.
21. Charles River. *research animal models - Wistar Kyoto (WKY) Rat*. [Online] [Citace: 10. 3. 2012.] dostupné z: <http://www.criver.com/en-US/ProdServ/ByType/ResModOver/ResMod/Pages/WKYRat.aspx>.
22. AnLab s.r.o. *Inbrední potkan, WKY-Potkan*. [Online] [Citace: 10. 3 2012.] dostupné z: <http://www.anlab.cz/laboratorni-zvirata/potkan/inbredni-potkan/>.
23. DEEKS E.D. a KEATIN G.M. Sunitinib. *Drugs*. 2006, vol. 66, č. 17, stránky 2255-2266.
24. BRANČÍKOVÁ D. a ADÁMKOVÁ KRÁKOROVÁ D. Sunitinib. *Remedia*. 2008, vol. 18, č.3, stránky 187-193.
25. ALBERTS B., BRAY D. a JOHNSON A. *Základy buněčné biologie : úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydání. Ústí nad Labem : Espero, 2005. ISBN 80-902906-2-0.
26. HOMSI J. a DAUD A.I. Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. *Cancer Control*. 2007, vol. 14, č.3, stránky 285-294.
27. KAPPERS M.H.W., ESCH J.H.M. a další. Hypertension induced by the tyrosine kinase inhibitor sunitinib is associated with increased circulating endothelin-1 levels. *Hypertension*. 2010, vol. 56, č. 4, stránky 675-681.
28. GALLEGO G.A., AFONSO F.A. a další. Molecular basis of hypertension side effects induced by Sunitinib. *Anti-Cancer Drugs*. 2011, vol.22, č. 1, stránky 1-8.

29. KUMAR R., CROUTHAMEL M.C. a další. Myelosuppression and kinase selectivity of multikinase. *British Journal of Cancer*. 2009, vol. 101, č.10, stránky 1717-1723.
30. FAIVRE S., DEMETRI G. a další. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov*. 2007, vol. 6, č. 9, stránky 734-745.
31. PAPAETIS G.S. a SYRIGOS K.N. Sunitinib: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in the era of molecular cancer therapies. *BioDrugs*. 2009, vol. 23, č. 6, stránky 377-389.
32. MIETTINEN M. a LASOTA J. Histopathology of gastrointestinal stromal tumor. *Journal of Surgical Oncology*. 2011, vol. 104, č. 8, stránky 865-873.
33. KIM E.J. a ZALUPSKI M.M. Systemic Therapy for Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors: Beyond Imatinib. *Journal of Surgical Oncology*. 2011, vol. 101, č. 8, stránky 901-906.
34. ALGABAA F., AKAZAB H. a další. Current pathology keys of renal cell carcinoma. *European Urology*. 2011, vol. 60, č. 4, stránky 634–643.
35. ZHU X., STERGIOPOULOS K. a WU S. Risk of hypertension and renal dysfunction with an angiogenesis inhibitor sunitinib: systematic review and meta-analysis. *Acta Oncologica*. 2009, vol. 48, č. 1, stránky 9-17.
36. DESHANE J., WRIGHT M. a AGARWAL A. Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochimica Polonica*. 2005, vol. 52, č. 2, stránky 273-84.
37. RYTER S.W., OTTERBEIN L.E. a další. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2002, Vol. 234-235, č.1-2, stránky 249-263.
38. NACHTIGAL P., SEMECKÝ V. a další. Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathology - Research and Practice*. 2004, vol.200, č. 3, stránky 219-229.
39. HOSICK P.A. a STEC D.E. Heme oxygenase, a novel target for the treatment of hypertension and obesity? *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2012, vol. 302, č.2, stránky R207-214.

40. ABRAHAM N.G. a KAPPAS A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacological Reviews*. 2008, vol. 60, č.1, stránky 79-127.
41. CAO J., INOUE K. a další. Physiological significance of heme oxygenase in hypertension. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009, vol. 41, č. 5, stránky 1025-1033.
42. BEIERWALTES W.H. Induction of heme oxygenase: can it really reverse hypertension? *Hypertension*. 2006, vol. 48, č. 4, stránky 555-557.
43. GEORGE E.M., ARANY M. a další. Induction of heme oxygenase-1 attenuates sFlt-1-induced hypertension in pregnant rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011, vol. 301, č. 5, stránky R1 1495-1500.
44. Drugs.com. *Sutent*. [Online] [Citace: 12. 3 2012.] dostupné z: <http://www.drugs.com/cdi/sutent.html>.